DOI:10.13523/j.cb.20170705

研究报告

PHP14 沉默对肺癌细胞凋亡的影响及其机制*

徐安健[1]** 李艳萌[1] 李斯文[1] 乌姗娜[2] 张 蓓[1] 黄 坚[1]
(1 首都医科大学附属北京友谊医院科研实验中心 北京 100875 2 首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心 北京 100875)

摘要 目的:在肺癌细胞中沉默 PHP14,并研究其对肺癌细胞凋亡的影响及其可能机制。方法:利用 shRNA 稳定沉默肺癌细胞株 A549 中 PHP14 的表达,并利用 Annexin V、PI 双染和流式细胞仪检测细胞在正常培养条件下和凋亡诱导条件下的凋亡情况;通过皮下接种裸鼠,探讨 PHP14 沉默对肺癌细胞体内成瘤的影响,并利用 Realtime-PCR 和 Western blotting 检测 PHP14 沉默后凋亡相关基因的表达情况。结果:成功获得了 PHP14 稳定沉默的肺癌细胞株,发现 PHP14 沉默可促进肺癌细胞诱导性凋亡,并抑制肺癌细胞的体内成瘤能力,并且发现 PHP14 沉默对肺癌细胞凋亡的影响可能是通过抑制 Bcl-2 表达实现的。结论:PHP14 沉默可促进肺癌细胞诱导性凋亡,并可能通过抑制 Bcl-2 影响肺癌细胞凋亡。

关键词 PHP14 细胞凋亡 体内成瘤 Bcl-2
中图分类号 Q819

人组氨酸磷酸酶蛋白 PHP14(也称为 PHPT1)是在脊椎动物中发现的第一个蛋白组氨酸磷酸酶[1-2]。除了 PHP14 的诸多底物如 ATP 循环裂解酶[3] 和 G 蛋白的 β 亚基[4] 被发现外,还发现其可能与多种分子如 HSP90α 相互作用[5],进而可能介导信号转导,参与疾病如肿瘤的发生和发展。

我们前期的研究发现,在肺癌细胞中干预 PHP14 表达,可以影响肺癌细胞的运动、浸润,甚至体内转移[6-8]。并且相对于癌旁组织,PHP14 在肺癌组织中高表达,表明 PHP14 不仅参与了肺癌细胞的运动和转移,可能还与肺癌成瘤相关[9]。此外,我们还发现,在正常细胞 NIH3T3 细胞中过表达 PHP14 后能赋予 NIH3T3 细胞体外非锚定依赖性生长能力,表明 PHP14 具有将正常细胞恶性转化的能力[10]。但 PHP14 在体内是否会影响肿瘤细胞的成瘤能力,其还影响了肿瘤细胞的哪些细胞特性,从而在肿瘤中发挥作用,还有待深入地探讨。

因此,本文首先在肺癌细胞 A549 中沉默了 PHP14 的表达,并探讨了其对肺癌细胞凋亡的影响。此外,我们还进一步通过小鼠体内成瘤实验,检测了 PHP14 沉默对肿瘤细胞体内成瘤能力的影响,以及其影响肺癌细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和材料

A549、H446 细胞为本实验室保存;包含 PHP14-siRNA 序列 CGGACATCTACGACAAAGT 的 shRNA-PHP14 载体构建如文献[6]所述;4~6 周龄雌性裸鼠购自维通利华公司;Lipofectamine 2000 Transfection Reagent 购自 Invitrogen 公司;嘌呤霉素购自 Sigma 公司;Annexin V 凋亡检测试剂盒购自 Abcam 公司;兔抗 Cleaved-Caspase-3 单克隆抗体、兔抗 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗 P53 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;小鼠抗 PHP14 抗体和小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠、山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2017-03-05 修回日期:2017-04-03
* 北京优秀人才培养项目(2016000021469G227)、北京友谊医院院启动项目(yyqdkt201516)资助项目
** 电子信箱:xuanjian1981@sina.com

1.2　细胞培养、转染

在六孔板中每孔接种 2×10^5 个/ml 细胞,并在37℃ 5%二氧化碳培养箱中培养 18~24h,使细胞达到对数生长期,达到 70%~80% 的细胞密度。将 6 孔板内的含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基更换为无血清 DMEM 培养基,并分别将 4μg 已测序验证的 shRNA-PHP14 表达载体用 Lipofectamine 2000 真核转染试剂转染,然后继续培养 4~6h。在将细胞培养液换成新的含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基后,放入二氧化碳培养箱中培养 24h。加入 G418 筛选 2 周,获得稳定克隆。

1.3　Annexin V 和 PI 双染及流式细胞仪检测细胞凋亡

用 0.25%不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶溶液消化细胞,制成单细胞悬液后移入 1.5ml 离心管中,2 000r/min 离心 5min;加入 PBS 洗涤细胞沉淀两次,收集 $1\sim5\times10^5$ 个细胞;加入 500μl 的 1×Binding buffer 重悬细胞;加入 5μl Annexin V-FITC 混匀,然后加入 5μl PI,混匀;室温,避光反应 15min;1h 内进行流式细胞仪检测,激发波长 488nm,发射波长 530nm。

1.4　小鼠皮下肿瘤模型

将 5×10^6 个肿瘤细胞皮下接种到裸鼠的腋下区域(每组 5 只小鼠)。然后每 3~5 天测量皮下肿瘤大小,并计算体积。所有动物实验都在动物护理和使用委员会的批准下进行。

1.5　实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

根据基因的开放阅读框(ORF)序列设计实时荧光定量 PCR 引物,PHP14 上游为 5′-TCAGTAGCCGTCGTTAGCC-3′,下游为 5′-TGCGACTGTGAGTGTCTGGG-3′;Bcl-2 上游为 5′-GAGGATTGTGGCCTTCTTTG-3′,下游为 5′-CCCAGCCTCCGTTATCCT-3′;GAPDH 内参基因上游引物为 5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3′,下游为 5′-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3′。用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA 并反转录成单链 cDNA,以此为模板,运用 UltraSYBR Two Step RT-qPCR Kit 试剂盒进行扩增反应,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.6　Western blotting

收集不同细胞系总蛋白质,分别取 20~50μg 蛋白质量的细胞总蛋白质样品及蛋白质分子质量 Marker,将处理好的样品按照预定的顺序加入上样孔中。接通凝胶电泳仪的电源,初始电压 60V;溴酚蓝染料的前缘进入分离胶上缘后提高电压至 160V,继续电泳直至溴酚蓝泳出分离胶的下缘。第一抗体封闭 4℃振摇过夜;用含 0.1% Tween 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)洗膜,第二抗体封闭室温下振摇 60min;以 TBST 洗膜。化学发光与曝光。

1.7　统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用方差分析,应用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。

2　结　果

2.1　PHP14 沉默肺癌细胞株的构建

为了探讨 PHP14 对肺癌细胞的影响,我们首先构建了包含 PHP14 shRNA 的表达载体,并稳定转染到肺癌细胞株 A549 中。如图 1 所示,在 A549 中转染 PHP14 shRNA 后,相对于对照细胞,PHP14 的 mRNA 和蛋白质水平都显著降低。

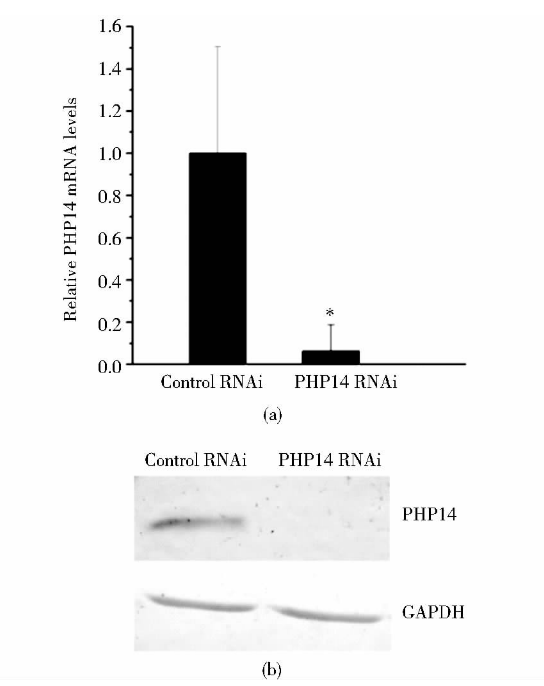


图 1　PHP14 沉默肺癌细胞株 A549 的构建

Fig. 1　The construction of PHP14 RNAi lung cancer cells

(a) Expression of PHP14 in A549 cells stably expressing control-RNAi or PHP14-RNAi as determined by quantitative PCR　(b) Expression of PHP14 in A549 cells stably expressing control-RNAi or PHP14-RNAi as determined by Western blotting

2.2　PHP14 沉默可促进肺癌细胞诱导性凋亡

接下来,我们通过 AnnexinV-FITC 和 PI 双染标记,经流式细胞仪,分析了 PHP14 沉默对肺癌细胞凋亡的影响。结果发现 PHP14 并不能直接导致肺癌细胞凋亡。然而,当我们用双氧水(H_2O_2)诱导肺癌细胞 A549 凋亡时,发现更多的 PHP14 沉默细胞发生了凋亡(图 2)。表明 PHP14 沉默使肺癌细胞对诱导性凋亡更敏感了。

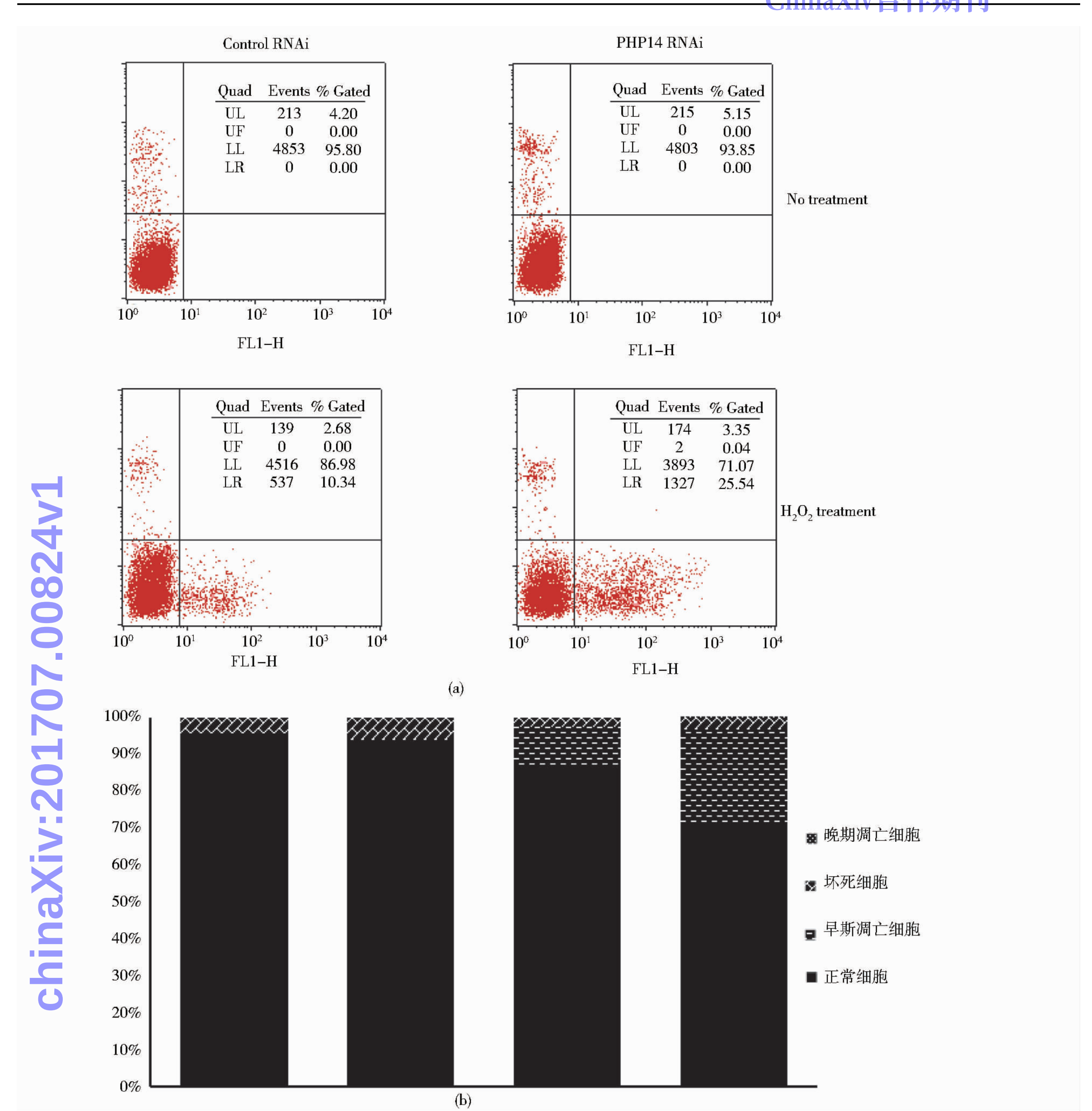


图 2 PHP14 沉默对肺癌细胞凋亡的影响

Fig. 2 The effect of PHP14 knockdown on apoptosis of lung caner cells

(a) The flow cytometry analysis of PHP14 knockdown on apoptosis of lung caner cells (b) The statistical analysis results of PHP14 knockdown on apoptosis of lung caner cells

2.3 PHP14 沉默可抑制肺癌细胞的体内成瘤能力

肿瘤细胞在体内的生长与体外培养不同,在体内,肿瘤细胞受到体内环境(如各种免疫细胞、生长因子、凋亡因子等)影响,会表现出与体外培养不一样的生长特性。我们发现,虽然沉默 PHP14 后,不能影响 A549 细胞的体外增殖能力,但显著抑制了 A549 细胞的体内成瘤能力(图 3),推测可能受体内促凋亡因子作用,PHP14 沉默的肺癌细胞凋亡增多,导致了其体内成瘤能力降低。

2.4 PHP14 沉默影响肺癌细胞凋亡的可能机制

为了进一步研究 PHP14 调控肺癌细胞凋亡的可能机制,我们通过定量 PCR 和 Western blotting 检测了 PHP14 沉默后 A549 细胞中 Bcl-2 的表达,以及

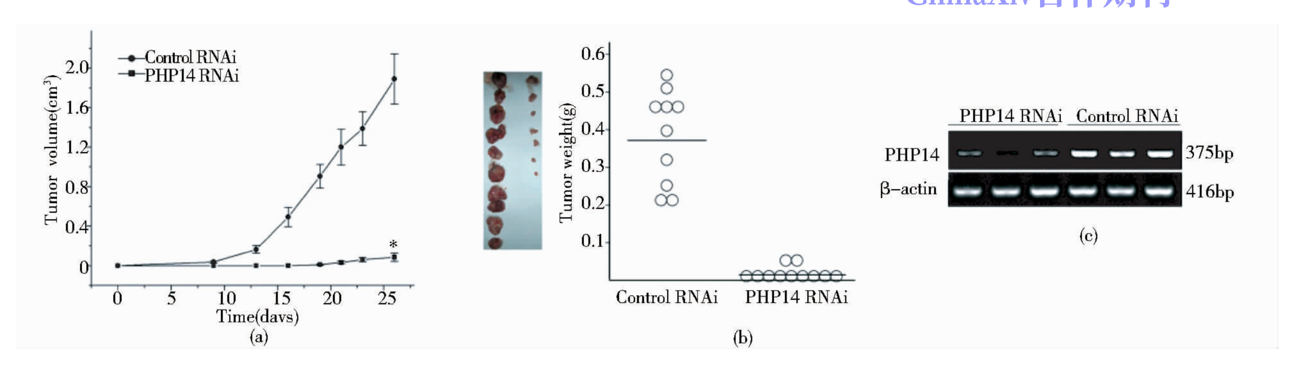


图 3　PHP14 沉默对 A549 体内成瘤能力的影响

Fig. 3　Knockdown of PHP14 expression in A549 cells inhibited the xenograft tumor growth *in vivo*

(a) Volumes of tumors that were derived from control-RNAi (closed circle) or PHP14-RNAi (closed square) cells were measured over times　(b) Xenograft tumors derived from control-RNAi or PHP14-RNAi on 26 days　(c) Expression of PHP14 mRNA was examined by semi-quantitative PCR of tumors cells from xenograft tumors

Caspase-3 的表达情况。结果发现,在 A549 中沉默 PHP14 后,显著降低了 Bcl-2 的表达,但直接导致细胞凋亡的 Caspase-3 的表达没有改变,这与我们流式细胞仪的检测结果符合,表明 PHP14 沉默并不能导致 A549 细胞直接凋亡,但降低了细胞抗凋亡的能力。在另一种 P53 缺失的肺癌细胞 H1299 中,我们也得到了同样的结果。

A549　Control RNAi　PHP14 RNAi
The relative expression of Bcl-2
Control RNAi　PHP14 RNAi

H1299　Control RNAi　PHP14 RNAi
The relative expression of Bcl-2
Control RNAi　PHP14 RNAi

Bcl-2
Caspase-3
p53
PHP14
GAPDH

(a)　(b)

图 4　PHP14 沉默对凋亡相关基因表达的影响

Fig. 4　The effect of PHP14 knockdownon the expression of apoptosis related genes

(a) The effect of PHP14 knockdownon the expression of apoptosis related genes in A549　(b) The effect of PHP14 knockdown on the expression of apoptosis related genes in H1299

3 讨 论

凋亡是细胞对环境的生理性病理性刺激信号、环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程[11]。凋亡是多基因严格控制的过程,这些基因在种属之间非常保守,如 Bcl-2 家族、Caspase 家族、癌基因(如 *C-myc*)、抑癌基因(*P53*)等。凋亡过程的紊乱可能与许多疾病,如肿瘤、自身免疫性疾病等的发生有直接或间接的关系。许多因素都能诱发细胞凋亡,如射线、药物等[12-14]。

本研究发现,在肺癌肿瘤细胞 A549 中沉默 PHP14 后,在诱发细胞凋亡的因素双氧水存在的情况下,可促进肺癌肿瘤细胞凋亡。进一步的机制研究发现,PHP14 沉默可降低肺癌肿瘤细胞中凋亡相关基因 *Bcl-2* 的表达。体内成瘤实验也进一步证实,PHP14 沉默对肿瘤的抑制作用,显示出降低的体内成瘤能力,推测 PHP14 沉默可能通过促进肿瘤细胞在体内的凋亡,从而抑制肿瘤在体内的生长。

我们以往的研究发现,PHP14 是一个可以促进肺癌细胞运动、浸润、转移的蛋白质,并且其还能赋予 NIH3T3 细胞体外非锚定依赖性生长能力,表明 PHP14 具有将正常细胞恶性转化的能力[6-10]。通过本文研究,我们更进一步证实了 PHP14 在肺癌肿瘤发生中的重要作用,即参与了肺癌肿瘤细胞的体内生长、成瘤,这拓宽了 PHP14 在肿瘤中的重要作用,也为我们将 PHP14 作为肿瘤抑制或者治疗靶点提供了实验依据。

参考文献

[1] Pia E K, Pettersson G, Bo E K, et al. Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. Eur J Biochem, 2002, 269(20):5016-5023.

[2] Klumpp S, Hermesmeier J, Selke D, et al. Protein histidine phosphatase: a novel enzyme with potency for neuronal signaling. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(12):1420-1424.

[3] Klumpp S, Bechmann G, Maurer A, et al. ATP-citrate lyase as a substrate of protein histidine phosphatase in vertebrates. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306(1):110-115.

[4] Maurer A, Wieland T, Meissl F, et al. The b-subunit of G proteins is a substrate of proteinhistidine phosphatase. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4):1115-1120.

[5] 徐安健, 蒋单懿, 黄凌云, 等. 人组氨酸磷酸酶 PHP14 的原核表达及其与 Hsp90 的体外互作研究. 中国生物工程杂志, 2010, 30(7): 7-11.
Xu A J, Jiang S Y, Huang L Y, et al. Prokaryotic expression, purification of human 14-kDa phosphohistidine phosphatase and its interaction with HSP90 *in vitro*. China Biotechnology, 2010, 30(7): 7-11.

[6] Xu A J, Hao J, Zhang Z, et al. 14-kDa phosphohistidine phosphatase and its role in human lung cancer cell. Lung Cancer, 2010, 67(1): 48-56.

[7] Xu A, Li X, Li S, et al. A novel role for 14-kDa phosphohistidine phosphatase in lamellipodia formation. Cell Adh Migr, 2016, 7:1-8.

[8] Xu A, Li X, Wu S, et al. Knockdown of 14-kDa phosphohistidine phosphatase expression suppresses lung cancer cell growth in vivo possibly through knockdownof NF-kappaB signaling pathway. Neoplasma, 2016, 63(4):540-547.

[9] Xu A J, Xia X H, Gu J C, et al. Clinical significance of PHPT1 in lung cancer. Chinese Medical Journal, 2010, 123(22):3247-3251.

[10] 徐安健, 崔永, 赵高潮, 等. 人组氨酸磷酸酶蛋白 PHP14 的过表达及其对 NIH-3T3 细胞体外增殖和非锚定依赖性生长的影响. 中国生物工程杂志, 2013, 33(6):7-11.
Xu A J, Cui Y, Zhao G C, et al. The overexpression of PHP14 and its effect on NIH-3T3 cells proliferation *in vitro* and Anchor Independent Growth. China Biotechnology, 2013, 33(6):7-11.

[11] Liu G, Pei F, Yang F, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 367.

[12] Vasilikos L, Spilgies L M, Knop J, et al. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins. Immunol Cell Biol, 2017, 95:160-165.

[13] Zheng J H, Viacava Follis A, Kriwacki R W, et al. Discoveries and controversies in Bcl-2 protein-mediated apoptosis. FEBS J. 2016, 83(14):2690-700.

[14] Beesoo R, Neergheen-Bhujun V, Bhagooli R, et al. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. Mutat Res, 2014, 768: 84-97.

The Effect of PHP14 Knockdown on Lung Cancer Cells Apoptosis and Its Mechanism

XU An-jian[1] LI Yan-meng[1] LI Si-wen[1] WU Shan-na[2] ZHANG Bei[1] HUANG Jian[1]
(1 Experimental Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100875, China)
(2 Clinical Laboratory Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100875, China)

Abstract Objective: To knockdown PHP14 expression in lung cancer cells, and investigate the effect of PHP14 knockdownon lung cancer cells apoptosis and its mechanism. Methods: Using shRNA stably knockdown PHP14 expression in lung cancer cell A549; detected apoptosis of control cells and PHP14 RNAi cells under normal culture and apoptosis-induced treatment using double staining of Annexin V and PI by flow cytometry; investigated the tumor growth of control cells and PHP14 RNAi cells *in vivo*, and detected the expression of apoptosis related genes by Realtime-PCR and Western blotting. Results: The expression of PHP14 was stably knockdown successfully, and knockdown of PHP14 could promote induced-apoptosis, as well as the tumor growth *in vivo*; furthermore, the effect of PHP14 knockdown on lung cancer cells apoptosis possobly via Bcl-2 suppression was found. Conclusion: knockdown of PHP14 could promote induced-apoptosis possobly via Bcl-2 suppression.

Key words PHPT1 Apoptosis Tumor growth *in vivo* Bcl-2